

Revue suisse Zool.	Tome 94	Fasc. 3	p. 481-489	Genève, septembre 1987
--------------------	---------	---------	------------	------------------------

# Von der Nervenzelle zum Verhalten<sup>1</sup>

von

**D. FELIX\***

Mit 5 Abbildungen

## ABSTRACT

**From the Nerve Cell to Behaviour.** — In seeking a unifying principle for the variety of actions exerted on the brain by peptides we have come to the conclusion that general peptidergic action occurs on the membranes of neurones and that it is the latter that vary by virtue of their connections to the brain circuitry which mediates different behavioural effects.

It has been shown that angiotensin injected into various brain areas elicits drinking behaviour and raises blood pressure. These effects can be inhibited by a specific competitor analogue such as saralasin. The active peptide involved in this influence on drinking behaviour and blood pressure is the octapeptide, angiotensin II. The actual receptors for angiotensin II are the starting point for entry into the complex brain circuits that control thirst, blood pressure and release of antidiuretic hormone. By defining these receptors in the brain we should be able to study the physiological mechanisms involved.

## EINLEITUNG

Ich möchte Herrn PD Dr. INGOLD und der Schweiz. Zoologischen Gesellschaft danken, dass sie mir die Gelegenheit boten, über ein aktuelles Thema zu berichten, das die Neurobiologie in vermehrtem Masse beschäftigt. Wir sind zwar noch weit entfernt, diesen Themenkreis in seiner Ganzheit zu verstehen — ich möchte als zellulär orientierter Neurobiologe versuchen, einen Bogen von der Einheit zum Ganzen zu spannen, d. h. den Weg von der Einzelzelle zum Verhalten aufzuzeigen.

---

\* Prof. Dr. D. Felix, Universität Bern, Abt. Zoophysiologie, Erlachstr. 9a, CH-3012 Bern, Schweiz.

<sup>1</sup> Veränderte Fassung des Vortrages, gehalten an der Jahresversammlung der SZG in Bern, 11. Oktober 1986.

Das Gehirn kann unter den verschiedensten Aspekten beschrieben werden. Die einen mögen spekulativ sein: Das Gehirn beinhaltet unser Denken und Handeln — es ist ein Organ, das selbst befähigt ist, über seine eigenen Gedanken nachzudenken. Andere Aspekte sind weniger spekulativ: Sie befassen sich mit den einzelnen Teilen und bestimmten Regionen, denen spezifische Funktionen zugewiesen werden. Viele Neurobiologen vertreten die Ansicht, dass das Verhalten die Summe der gesamten Aktivierung von Hirnsystemen mit komplexer Verschaltung darstellt. Man wird also nach Modellsystemen suchen, die zeigen, wie Nervenzellen zusammenwirken um ein bestimmtes Verhaltensmuster auszulösen.

## PEPTIDE IM GEHIRN

Seit Jahren ist bekannt, dass sich die Natur niedermolekularer Peptidstrukturen bedient, um physiologische Vorgänge im Körper zu regeln. Dass Peptide — also aus zwei oder mehreren Aminosäureresten aufgebaute Verbindungen — neben dieser Steuerfunktion auch an Übertragungsprozessen im Gehirn beteiligt sind, ist erst in neuester Zeit

### Peptide in Hirn und Rückenmark

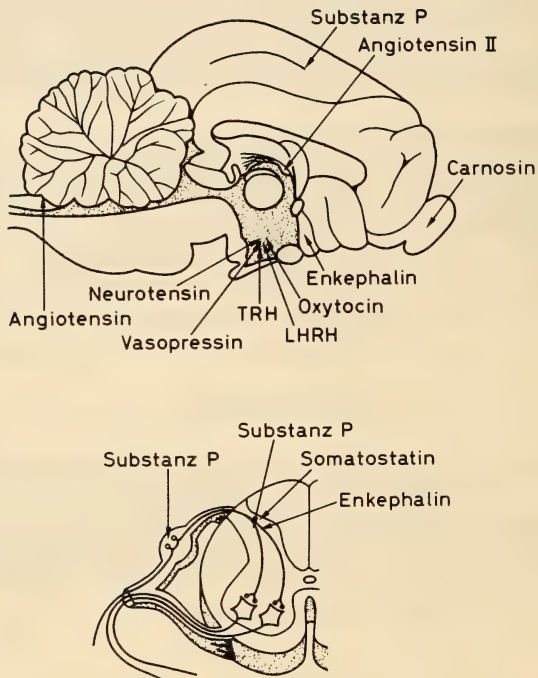


ABB. 1.

Peptide mit neuronaler Funktion in spezifischen Regionen des Gehirns (oben) und des Rückenmarks (unten).

Als Beispiel wurde das Gehirn einer Katze gewählt.

bekannt geworden. Der Ausdruck „peptiderge Nervenzelle“ bezog sich ursprünglich nur auf Neurone des Zwischenhirns, welche Oxytocin und das antidiuretische Hormon ADH synthetisieren und freisetzen. Peptiderge Neurone waren damit funktionell wie morphologisch dem neurosekretorischen System zugeordnet. ZETLER (1976) revidierte diese strikte Einteilung, nachdem Peptide in verschiedensten Zentren des Gehirns nachgewiesen wurden. Seither ist einer der spannendsten neurobiologischen Wettstreite im Gange: Die Erforschung der physiologischen Bedeutung der Peptide im Nervensystem. Wir stehen noch am Anfang der Beweisführung, doch bringt die Anhäufung der entsprechenden Literatur bereits die Gewissheit, dass hier eine Klasse von Substanzen vorliegt, welche mit den neuronalen Übertragungsmechanismen eng verknüpft ist. Interessanterweise sind viele der Peptide aus peripheren Systemen längst bekannt. Die erste Abbildung macht uns mit einigen Namen von Peptiden bekannt, wobei es sich nur um einen momentanen Überblick handeln kann. Die Raschheit der Peptidforschung lässt keinen Anspruch auf Vollständigkeit zu. Im Gehirn wie im Rückenmark sind die Peptide meist spezifischen Strukturen oder Regionen zugeordnet (Abb. 1).

Mit der Propagierung von Peptiden als neue Gruppe von Neurotransmittern oder Neuromodulatoren stellt sich die Frage, weshalb das Zentralnervensystem so viele verschiedene Überträgersubstanzen kennt, nachdem die Informationsübertragung an der Synapse nur inhibitorischer oder exzitatorischer Natur ist. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten liegen vor: Einerseits wird dadurch eine unterschiedliche Dauer der Aktion garantiert, andererseits können durch die Spezifität langdauernde Veränderungen der neuronalen Funktion eingeleitet werden. Zusätzlich können solche Substanzen z. B. durch Transport via Blut an Orten wirken, welche vom Syntheseort weit entfernt liegen. Dies bedingt aber das Vorhandensein spezifischer Moleküle.

## PEPTIDE UND VERHALTEN

Von besonderem Interesse für Neurobiologen ist die Tatsache, dass verschiedene Peptide charakteristische Verhaltensänderungen verursachen. Solche Substanzen können primitivstes lebenserhaltendes Verhalten, wie Trinken, Essen, Abwehrreaktion, Fluchtreaktion beeinflussen. Peptide können aber ebenso höher entwickelte Sinnesleistungen wie Gedächtnis und Lernverhalten bei Tieren anregen. Selbstverständlich lassen sich dabei niemals die an einer Tierart gewonnenen Ergebnisse und Kenntnisse direkt auf den Menschen übertragen. Auch der Modifizierbarkeit des Verhaltens bei Tieren sind gewisse Grenzen gesetzt, die in der Anpassung wie in der genetischen Vorprogrammierung liegen. Unbekannt bleibt auch, ob die vielen exogen applizierten Peptide im Organismus selbst eine Funktion besitzen, oder ob sie nur befähigt sind, in die biochemischen Prozesse der Körpers einzugreifen und spezifische Reaktionen auszulösen.

In den folgenden Ausführungen möchten wir auf ein Peptid eingehen, dem erst in neuester Zeit eine Rolle an zentralnervösen Neuronen zugewiesen wurde: Angiotensin II. Warum man so spät auf die neuronale Beteiligung dieses Peptides stieß, liegt vielleicht daran, dass Angiotensin primär als zirkulierender Teil des Renin-Angiotensin-Systems den Flüssigkeitshaushalt des Körpers reguliert. Da Renin aus der Niere stammt, konnte man sich nicht vorstellen, wie eine peripher auftretende Substanz eine zentralnervöse Rolle ausüben konnte. Zwar hatte vor einigen Jahren FITZSIMONS (siehe Monographie, 1972) ein Experiment durchgeführt, das eine Beziehung zum Gehirn vermuten liess. Er injizierte wassergesättigten Ratten ein Extrakt aus Nierengewebe, was die Tiere zur sofortigen weiteren

Wasseraufnahme drang. Dieser dipsogene Faktor entpuppte sich als das Renin, einem eiweissabbauenden Enzym der Niere. EPSTEIN *et al.* (1970) wiederholte FITZSIMONS Experiment, benutzte aber anstelle eines Nierenextraktes Angiotensin II. Intrakraniale Injektionen dieses Peptides in verschiedenen Regionen des Zwischenhirns lösten nun ebenfalls massives Trinkverhalten sowie Blutdruckerhöhung aus (Abb. 2). Noch blieb aber die Frage offen, auf welche Weise Angiotensin dieses Verhalten auslösen könnte. Diese Frage gewann sprunghaft an Interesse als GANTEN *et al.* (1971) in Heidelberg endogenes Angiotensin im Hirn entdeckte. Gab es neben dem peripheren Angiotensinsystem ein ähnliches Renin-Angiotensin-System im Gehirn? In der Tat fand man unabhängig von der Präsenz der Niere im Gehirn das Reninsubstrat Angiotensinogen, das Enzym Renin und Angiotensinase. Die Syntheserate für Angiotensin II ist im Gehirn sogar 30 mal grösser als im Plasma.

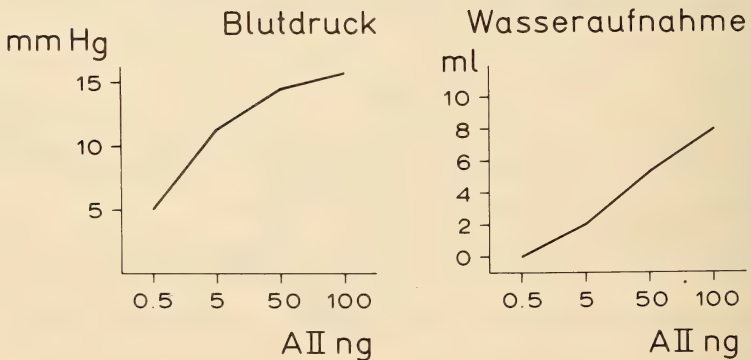
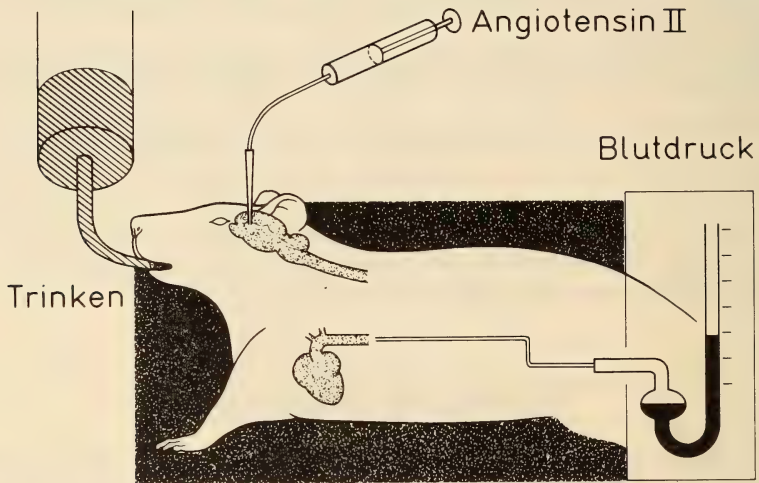


ABB. 2.

Intraventriculär appliziertes Angiotensin II verursacht bei Ratten Blutdrucksteigerung und induziert Trinkverhalten.

Ein weiteres Problem bildet die Spezifität der Wirkung. Angiotensin-Injektionen führen neben der erwähnten dipsogenen Reaktion zusätzlich zur Ausschüttung des Hormons ACTH, sowie des antidiuretischen Hormons ADH, doch scheinen diese Wirkungen indirekter Natur zu sein. Die dipsogene Wirkung bleibt auf das Oktapeptid Angiotensin II beschränkt. Renin und Angiotensin I lösen zwar Trinkverhalten aus, doch bleibt die Wirkung aus, wenn die Umwandlung zu Angiotensin II im Gehirn verhindert wird. Die Wirkung von Angiotensin II hingegen wird durch einen spezifischen kompetitiven Blocker, das Saralasin, unterbunden. Saralasin ist ein Angiotensin II-Analog mit unterschiedlichen Aminosäuren an den beiden Endstellen. Die Wirkung von Angiotensin II kann ebenfalls durch Bildung von Antikörpern blockiert werden. Damit haben wir gute Gründe anzunehmen, dass nur das Oktapeptid für die dipsogene Wirkung in Frage kommt.

Nachdem wir um die Existenz eines neuronalen endogenen Renin-Angiotensin-System wissen, stellt sich die wichtige Frage der Lokalisation dieses Systems. EPSTEIN *et al.* (1970) lokalisierten die Rezeptorstellen im Gebiet des Ventrikelsystems. Diese Hypothese wird durch die Befunde von SIMPSON & ROUTTENBERG (1973) unterstützt. Intraventrikuläre Injektion von geringen Mengen Angiotensin in die Nähe des Subfornikalorganes, einem millimetergrossen Organ im III. Ventrikel (Abb. 3A), löst kurzlatentes Trinken aus; Läsionen dieses Organs verhindern das induzierte Trinken.

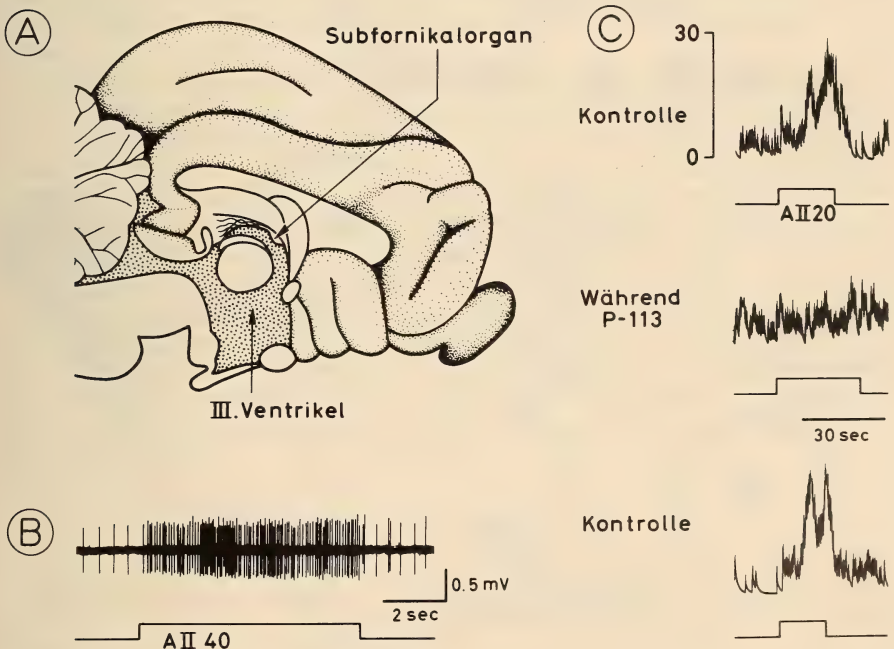


ABB. 3.

Die Wirkung von Angiotensin II (A II) im Subfornikalorgan (A):  
 Direkte Zugabe von Angiotensin II erregt die spontane Entladungsrate von SFO-Neuronen (B).  
 Der spezifische Antagonist von Angiotensin II, Saralasin (P-113)  
 antagonisiert in spezifischer und reversibler Weise diese Wirkung (C).

In unserem Labor sind wir der Frage nachgegangen, ob die zentrale Wirkung von Angiotensin ein komplexes indirektes Phänomen darstelle oder ob Nervenzellen des Subfornikalorgans direkt auf die Applikation des Peptides reagieren würden (FELIX *et al.* 1982). Unsere Arbeiten bestätigen, dass Nervenzellen spezifisch und kurzlatent durch Angiotensin II aktiviert werden (Abb. 3B). Diese exzitatorische Wirkung wird durch Zugabe des kompetitiven Angiotensin II-Inhibitors Saralasin spezifisch antagonisiert (Abb. 3C). Untersuchungen mit Angiotensin-Fragmenten erlaubten es, die physiologisch aktive Komponente des Angiotensin-Moleküls darzustellen (FELIX & SCHLEGEL 1978). Eine Abspaltung der Asparaginsäure führt zu einer leicht verkürzten Latenzzeit und einer signifikant höheren Stimulation der spontanen Entladungsrates, was darauf schließen lässt, dass das sogenannte Angiotensin III für die biologische Wirkung verantwortlich ist. Bei weiterer Abspaltung von Aminosäuren nimmt die Aktivität ab und verliert beim Tripeptid seine Wirkung. Diese Befunde bestätigen, dass Neurone des Subfornikalorgans spezifische Rezeptorstellen für Angiotensin II oder III besitzen. Neuere Arbeiten mit immunhistochemischen und biochemischen Methoden weisen darauf hin, dass neben dem

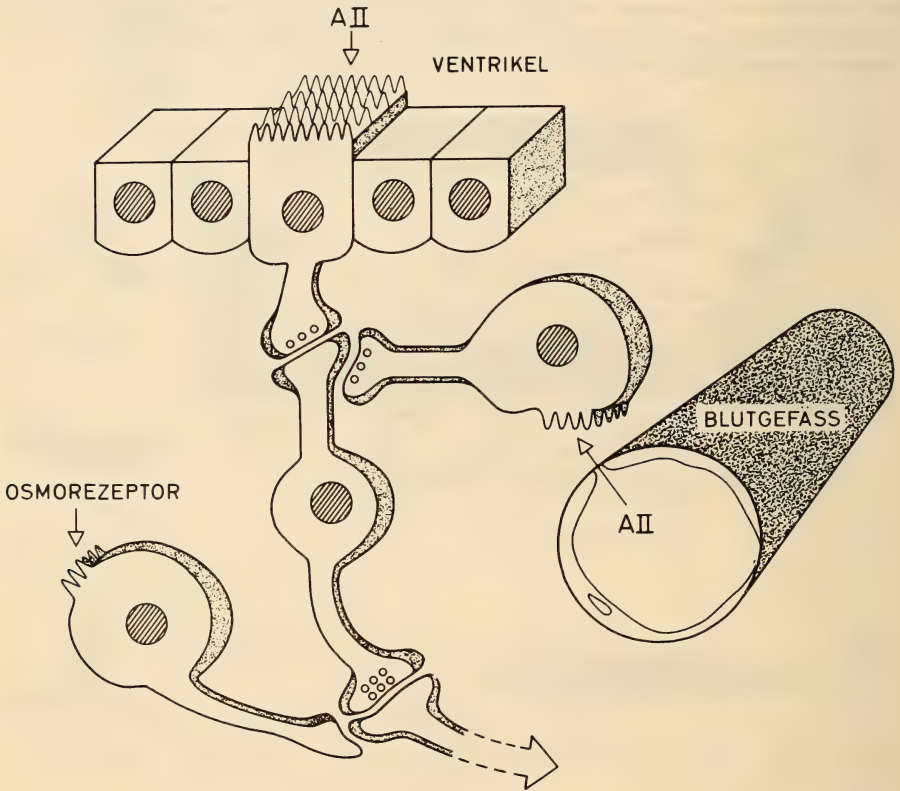


ABB. 4.

Schematisches Diagramm möglicher Angiotensinrezeptoren (A II) im Ventrikelsystem des Gehirns und im Gefäßsystem. Eine Beteiligung von Osmorezeptoren unterstützt den neuronalen Schaltkreis.

Subfornikalorgan spezifische Angiotensin Bindungsstellen und Angiotensin-enhaltende Nervenendigungen in verschiedenen supraspinalen und spinalen Regionen vorkommen. Die breite Verteilung von Angiotensin-Immunreaktion zeigt, dass das Angiotensin-System im Gehirn nicht exklusiv mit dem Ventrikelsystem korreliert ist. Ein uniformes Prinzip über die Angiotensin-Wirkung im Gehirn besteht nicht. Die Abb. 4 mag schematisch. z. T. hypothetische Rezeptorstellen für die zentrale Wirkung des Oktapeptides illustrieren: a) Rezeptorstellen mit direktem Kontakt zur Ventrikeloberfläche setzen die Präsenz des Peptides in der cerebrospinalen Flüssigkeit voraus. b) Rezeptorstellen im Kontakt mit Blutgefäßen bedingen das Fehlen einer Bluthirnschranke. Dies trifft z. B. für das Subfornikalorgan zu. Beide Rezeptorstellen stehen im Kontakt mit einem neuronalen Schaltkreis, welcher das Trinkverhalten kontrolliert. In diesen Kreis muss die Beteiligung von Osmorezeptoren in ventrikelnahen Regionen miteinbezogen werden.

### ANGIOTENSIN-SYSTEM IM GEHIRN

In neuester Zeit haben sich viele Forschergruppen mit der Darstellung von Angiotensin-Projektionen im Hirngewebe befasst. In einzelnen Fällen gelang es, Faserfragmente oder wenige angiotensinerge Nervenzellen zu erkennen. Zusammenhängende Projektionen, wie man es von einem neuronalen System erwarten würde, konnten jedoch nie in befriedigendem Masse dargestellt werden. Methodische Verbesserungen der immunhistochemischen Technik haben in neuester Zeit geholfen, diese Schwierigkeiten zu überwinden.

Die meisten immunhistochemischen Studien für den Nachweis von Angiotensin im Gehirn wurden mit Hilfe von ungereinigten Angiotensin-Antikörpern durchgeführt und ergaben diffuse Färbung von Neuronen und einzelnen Fasern in verschiedenen Regionen des Zwischenhirns. In unserm Labor ist es IMBODEN *et al.* (1987) mit Hilfe eines affinitätsgereinigten Angiotensin-Antiserums gelungen, spezifische Angiotensinprojektionen im Hypothalamus nachzuweisen. Eine Reinigung des Antikörpers eliminierte die bisher bekannte diffuse Färbung und führte zur Markierung von relativ kleinen Zellen mit kurzen Fortsätzen in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten. In Abb. 5 ist eine vollständige Markierung eines angiotensinergen Fasersystems und spezifischen Neuronen einer Projektion von Nucleus paraventricularis zur Hypophyse dargestellt. Durch die verbesserte immunhistochemische Methode gelang es erstmals feine Fasern mit sogenannten Varikositäten zu erkennen und damit ein spezifisches Angiotensinsystem zu charakterisieren. Diese neuen Erkenntnisse erfordern eine Überprüfung der topographischen Karten von Angiotensin im Gehirn.

### ENDSTATION VERHALTEN

Durch die Darstellung angiotensin-spezifischer Rezeptoren in verschiedenen Regionen des Gehirns wie z. B. Subfornikalorgan, Hypothalamuskern mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken und die Sichtbarmachung angiotensinerner Systeme mit Hilfe immunhistochemischer Methoden haben wir einzelne Bausteine eines Systems im Gehirn kennengelernt, das, wie eingangs erwähnt, eng mit dem Trinkverhalten verknüpft ist. Neben der peripheren Flüssigkeitskontrolle besitzt das Gehirn spezifische Strukturen, welche befähigt sind, durch übergeordnete Kontrollzentren Verhaltensreaktionen wie z. B. das Durstverhalten zu beeinflussen. Noch bleiben viele Fragen unbeantwortet: Übt Angiotensin eine Rolle als

Überträgersubstanz? Wie wird die endogene Freisetzung von Angiotensin im Gehirn gesteuert? Welche Beteiligung an der zentralen Wirkung von Angiotensin besitzt das peripher zirkulierende Angiotensinsystem? Rasche Fortschritte auf dem Gebiet der Forschung werden uns sicher neue Aspekte über die neuronalen Wirkungsmechanismen dieser Substanz eröffnen.

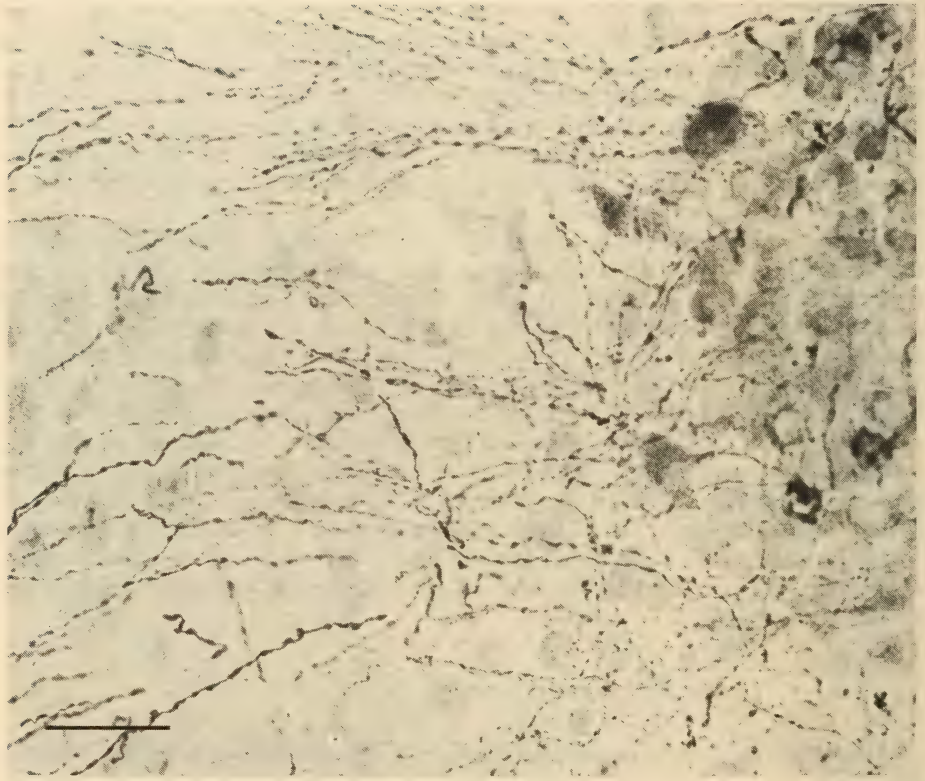


ABB. 5.

Immunohistochemischer Nachweis von Angiotensinsystemen im Gehirn.  
Markierung angiotensinergischer Nervenzellen im Nucleus paraventricularis (oben rechts)  
und spezifischer Fasern im Hypothalamus. (Aufnahme Dr. H. Imboden). Balkenlänge 20  $\mu\text{m}$ .



## RÉSUMÉ

En recherchant un principe commun relatif à la gamme d'activités exercées par les peptides dans le cerveau, nous avons conclu qu'une activité générale peptidergique s'exerce sur la membrane neuronale et que ce sont les neurones qui varient en fonction de leurs connections au circuit cérébral conduisant ainsi à des effets divers sur le comportement.

Il a été démontré que l'angiotensine injectée dans diverses régions cérébrales provoque la soif et augmente la tension artérielle. Ces effets peuvent être inhibés par un analogue spécifique compétiteur comme la saralaline, par exemple. Dans ce cas le peptide actif est l'octapeptide angiotensine II. Les véritables récepteurs de l'angiotensine II représentent le point de départ de l'entrée dans les circuits cérébraux complexes qui règlent la soif, la tension artérielle et la sécrétion de l'hormone antidiurétique. La localisation de ces récepteurs cérébraux devrait nous permettre d'étudier les circuits neuronaux responsables de ces mécanismes physiologiques.

## VERDANKUNG

Die Forschungsarbeiten in unserem Labor wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds (Kredit 3.627-0.84) unterstützt. Wir möchten Frau R. Bandi für die Vorbereitung dieses Manuskripts danken.

## LITERATUR

- EPSTEIN, A. N., J. T. FITZSIMONS and B. ROLLS. 1970. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *J. Physiol., Lond.* 210: 457-474.
- FELIX, D. and W. SCHLEGEL. 1978. Angiotensin receptive neurones in the subfornical organ. Structure-activity relations. *Brain Res.*, 149: 107-116.
- FELIX, D., P. SCHELLING and H. L. HAAS. 1982. Angiotensin and single neurons. *Expl. Brain Res. Suppl.* 4: 255-269.
- FITZSIMONS, J. T. 1972. Thirst. *Physiol. Rev.* 52: 468-561.
- GANTEN, D., J. E. MINNICH, P. GRANGER, K. HAYDUK, H. M. BRECHT, A. BARBEAU, R. BOUCHER and J. GENEST. 1971. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science*: 173, 64-65.
- IMBODEN, H., J. W. HARDING, D. GANTEN and D. FELIX. 1987. Comparison of angiotensin II staining in rat brain using affinity purified and crude antisera. *Clin. Exp. Hypertens.*: in press.
- SIMPSON, B. and A. ROUTTENBERG. 1973. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. *Science* 181: 1172-1175.
- ZETLER, G. 1976. The peptidergic neuron: A working hypothesis. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1817-1818.